



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BIOSSENSORES SALIVARES - ESTADO DA ARTE

Trabalho submetido por
Filipa Alexandra Martins Cantiga
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Outubro de 2015



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BIOSENSORES SALIVARES - ESTADO DA ARTE

Trabalho submetido por
Filipa Alexandra Martins Cantiga
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Alexandra Bernardo

Outubro de 2015

Dedicatória

Aos meus pais e à minha irmã,
que sempre acreditaram e me apoiaram neste percurso.

Agradecimentos

Após seis anos de dedicação e trabalho chegou o momento tão aguardado.

Primeiramente quero agradecer a ajuda e cooperação da minha orientadora, a Prof. Dra. Alexandra Bernardo pela paciência, pelo conhecimento que me transmitiu e ajuda prestada, tal como aos honrados Professores e restante Academia que contribuíram para a minha formação.

A todos os meus amigos e companheiros de curso. Este curso não se faz sozinho. É preciso amigos e colegas para nos ajudarem e estudarem connosco de maneira a alcançarmos todos o nosso objetivo. Destaco os que me acompanharam desde o início como Tânia Rodrigues, Isabel Silva, Catarina Silva, Inês Mouquinho, Alexandre Rebocho e Rui Fernandes, e os que apareceram surpreendentemente no final desta etapa como Sara Kittler, Sara Afonso, Rita Pires, Ana Beatriz Guerreiro, Raquel Gameiro, Chantelle Teixeira e a todos os outros que não tenho espaço para os citar mas que estão no meu coração. A todos eles agradeço por me terem apoiado sempre no nosso percurso académico, que nos uniu de tal forma que com certeza perdurará uma forte amizade e companheirismo.

Gostaria de agradecer também ao Coro Académico Egas Moniz por me oferecer um escape onde a boa-disposição e a música ajudaram a que todo o trabalho árduo ficasse mais harmonioso.

E por fim, os mais importantes. Não existem palavras que demonstrem a minha gratidão a minha família, principalmente aos meus pais, Paulo Cantiga e Ermelinda Martins, e à minha irmã Mariana, que por mim tudo fizeram e me proporcionaram a possibilidade de realizar um dos meus sonhos. Obrigada por me acompanharem neste percurso que é a vida. A todos os familiares que infelizmente já não puderam assistir a esta conquista, mas que sempre estarão no meu coração.

A Todos o meu sincero e grande Obrigado!

Saudações Académicas

Filipa Cantiga

Outubro de 2015

RESUMO

Enquadramento: A análise do fluído salivar tem sido alvo de investigação nos últimos anos com o objetivo validar técnicas de identificação e doseamento de biomarcadores com valor de diagnóstico dado que a utilização da saliva para análises em detrimento do sangue traz vantagens claras.

Objetivo: Esta monografia tem como objetivo reunir informação atual sobre a aplicação de biossensores salivares no diagnóstico e monitorização do cancro, diabetes, VIH e hepatites bem como das suas aplicações no sector farmacêutico.

Métodos: A metodologia adotada neste trabalho assenta numa pesquisa bibliográfica na base de dados *on-line PubMed* de artigos publicados preferencialmente entre os anos de 2000 a 2015. Foram utilizadas as palavras-chave: “*cancer biomarkers*”, “*cancer biossensor*”, “*diabetes*”, “*diabetes biossensor*”, “*HIV*”, “*HIV diagnosis*”, “*HIV biossensor*”, “*hepatitis*”, “*hepatitis diagnosis*”, “*hepatitis biossensor*”, cruzados com “*saliva*”. Os dados de epidemiologia foram retirados do *site* da internet da FDA, INFARMED, DGS e INE. Para organização e gestão de citações e referências bibliográficas foi utilizado o programa Mendeley *Desktop*[®], versão 1.13.8.

Resultados: Nesta revisão foram utilizados 32 artigos resultantes da pesquisa bibliográfica. Foram identificados biossensores com aplicação no sector farmacêutico para o VIH mas áreas da Diabetes, hepatites e cancro existem vários trabalhos de investigação mas não se encontraram até ao momento biossensores salivares totalmente funcionais e creditados.

Conclusão: Esta área de investigação ainda se encontra em fase inicial para a maior parte das doenças pois é necessário validar esta técnica para os diferentes biomarcadores (esperando-se que igualem ou superem a sensibilidade e especificidade dos métodos até agora utilizados) para posteriormente se poderem desenvolver biossensores específicos.

ABSTRACT

Framework: the analyses of saliva with the goal to validate identification techniques and the quantification of biomarkers as a diagnostics tool has been the target of a lot of scientific research. Using saliva instead of blood brings a lot of advantages.

Objectives: The goal of this monograph is to reunite all the current information about the applications of salivary biosensors in the diagnosis and monitorization of cancer, diabetes, hepatitis and HIV and their applications in the pharmaceutical area.

Methods: the methodology of this work was based on a bibliographic research using *PubMed* the on-line data base and considering articles published, preferentially, between 2000 and 2015. The key words that were used were “*cancer biomarkers*”, “*cancer biosensor*”, “*diabetes*”, “*diabetes biosensor*”, “*HIV*”, “*HIV diagnosis*”, “*HIV biosensor*”, “*hepatitis*”, “*hepatitis diagnosis*”, “*hepatitis biosensor*”, crossed over with “*saliva*”. The epidemiologic data were obtained on the FDA, INFARMED, DGS and INE internet sites. To organize and manage the bibliographic references was used the program Mendeley Desktop[®], version 1.13.8.

Results: In this bibliographic revision were used 32 articles. There was identified a biosensor with applications in the pharmaceutical sciences to HIV but in diabetes, hepatitis e cancer exists a lot of papers on their investigations but aren’t any biosensors completely functional yet.

Conclusion: the investigation is steel is the beginning for most diseases because is needed to validate the technique for different biomarkers and after that is necessary to develop the biosensors

Índice Geral

Introdução Geral e Objetivo.....	17
Metodologia de Pesquisa	21
Estado da Arte	23
Diagnóstico e monitorização de patologias através de biossensores	
Biossensores tumorais.....	23
Cancro da Mama	25
Cancro do Pâncreas.....	26
Cancro da Cabeça.....	27
Cancro do Pulmão.....	28
Cancro do Ovário.....	30
Biossensores para diabetes.....	32
Biossensores para VIH.....	34
Biossensores para Hepatite	36
Hepatite A	36
Hepatite B	37
Hepatite C	38
Resumo de biomarcadores e respetivos biossensores	40
Utilização de biossensores a nível hospitalar e comunitário.....	48
Conclusão	50
Referências Bibliográficas	52

Índice de tabelas

Tabela 1 - Marcadores tumorais aprovados pela FDA24

Tabela 2 - Tabela resumo de biomarcadores e respectivos biossensores com aplicação no cancro, Diabetes Mellitus, VIH e Hepatite A, B e C41

Lista de Abreviaturas

- ADN – Ácido desoxirribonucleico
- ARN – ácido ribonucleico
- DGS – Direcção Geral de Saúde
- ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- FDA – Food and Drug Association
- GLTSCR2 – (pâncreas)
- hCG - gonadotrofina coriónica humana
- IgG – imunoglobulina G
- IgM – Imunoglobulina M
- INE – Instituto Nacional de Estatística
- INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e dos Produtos de Saúde I.P.
- IPMN - Intraductal Papillary Mucinous Neoplasia
- KRAS – (pâncreas)
- LCR - líquido cefalorraquidiano
- MBD3L2 – (pâncreas)
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- PCR – Polymerase Chain Reaction
- RNAmi – ARN's micro
- TAC – Tomografia Axial Computorizada
- TPT1 – (pâncreas)
- UPLC–ESI-MS – ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry
- VHA – vírus da hepatite A
- VHB – vírus da hepatite B
- VHC – vírus da hepatite C
- VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

Introdução Geral e Objetivo

Desde o início dos tempos que se procura conhecer o funcionamento do corpo humano, as patologias que o afetam e a sua possível cura.

Um dos componentes de diagnóstico é a análise de fluidos corporais.

No corpo humano existem vários fluidos corporais dos quais se conseguem obter informações sobre o nosso estado geral de saúde. Alguns deles estão amplamente estudados como é o caso do sangue ou da urina, outros nem tanto como é o caso da saliva.

Cada pessoa tem em média 5 litros de sangue divididos em 3 litros de células (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) e 2 litros de plasma. Através da análise deste fluido podem-se realizar vários despistes como é o caso de anemias, leucemias, problemas na coagulação, existência de infeção, etc. (Balfe & Cannon, 2009) A urina é um ultrafiltrado de plasma produzido nos rins e é principalmente constituída por ureia. A análise à urina dá-nos a quantificação da excreção de sais e outros componentes existentes no corpo humano. (Balfe & Cannon, 2009)

Podem ainda ser realizadas análises usando o líquido cefalorraquidiano (LCR), o fluido pleural, o fluido peri cardial, o suor, o líquido amniótico, o líquido sinovial e a saliva.

A saliva como alvo de exames médicos apresenta inúmeras vantagens quando comparadas com os fluidos mais utilizados na prática médica.

A saliva é um líquido transparente, com um pH entre 6 e 7, constituído por água, proteínas e substâncias inorgânicas (Humphrey & Williamson, 2001) e é produzida por diversas glândulas divididas em *major* (parótida, submandibular e sublingual), onde é feita cerca de 90% de toda a produção, e *minor* (bocais, linguais, labiais e palatinas) (Yoshizawa, et al., 2013). A saliva tem como principais funções o apoio à digestão, à deglutição, a lubrificação da mucosa oral e ainda proteção (Tiwari, 2011).

É possível fazer o diagnóstico de doenças sistémicas utilizando a saliva pois muitos dos biomarcadores estão presentes neste fluído. Os biomarcadores salivares provêm essencialmente de duas vias: ou as proteínas que circulam no sangue passam para a saliva ou são produzidas pelas glândulas salivares. As moléculas podem passar do sangue para a saliva por diversos métodos (difusão passiva, transporte ativo, ultrafiltração e exsudado) e desta forma é possível o seu doseamento e posterior informação com valor de diagnóstico. (Bosch, 2014)

A utilização da saliva para análises em detrimento do sangue traz vantagens claras como é o caso do aumento do conforto para o doente pois a colheita de saliva é uma técnica não-invasiva; é mais económico uma vez que não é necessário pessoal altamente qualificado para a recolha da amostra; é uma colheita muito mais segura para o coletor no que diz respeito à possível infeção cruzada de doenças, como VIH, e o armazenamento é mais fácil uma vez que não existe possível coagulação da amostra. (Yoshizawa, et al., 2013).

A colheita de saliva apesar de ter a vantagem de ser não invasiva requer cuidados metodológicos de forma a garantir a validade e integridade da amostra. Assim, quando se faz uma colheita de saliva tem que se escolher o método de recolha consoante a amostra desejada, isto é, se o que se pretende colher é um exsudado, uma amostra de saliva total ou se é saliva produzida por uma glândula específica.

A amostra mais utilizada é a saliva total e, por ser tão fácil a sua recolha, não é necessário que a mesma seja feita por pessoal especializado podendo ser realizada pela própria pessoa ou por pessoal sem formação específica em análises clínicas. Existem alguns procedimentos simples a ter em consideração e que é importante ser divulgado às pessoas que realizam a colheita, como por exemplo: a hora da realização da colheita é relevante, não devem lavar os dentes, comer, mascar pastilhas elásticas ou beber, com a exceção de água, até 30 minutos antes da colheita e antes da colheita devem bochechar com água destilada.

Esta colheita pode ser feita com ou sem estímulos. As colheitas sem estímulos podem ser feitas por dois métodos: no primeiro deixa-se a saliva escorrer pelo lábio inferior da pessoa, sem qualquer movimento oral, e colhe-se num recipiente de plástico e no segundo a pessoa tem de cuspir para dentro do recipiente. Este segundo método compromete mais a amostra e o seu armazenamento pois contem mais bactérias do que uma amostra recolhida pelo primeiro método descrito.

As colheitas com estímulos podem ser feitas através do recurso a ácido cítrico ou através estímulos mecânicos, como a mastigação durante 1 a 2 minutos com a ajuda de pastilhas de parafina ou borracha, e seguidamente são colhidas através de zaragatoas de algodão ou, para evitar interferências, utilizando zaragatoas de algodão de poliestireno.

Após a colheita o passo seguinte, o de armazenamento, é também crucial para uma boa análise posterior. Essencialmente as amostras devem ser armazenadas de acordo com o tempo de espera até à análise. Se a análise é para ser feita imediatamente a seguir à

colheita e no máximo até 30-90 minutos esta pode permanecer à temperatura ambiente. Se a análise for feita no mesmo dia da colheita dentro do intervalo de 3-6 horas a amostra deve ser guardada no frigorífico a uma temperatura de 4°C. Se a análise for feita dias ou meses após a colheita esta deve ser conservada preferencialmente a -80°C. A refrigeração das amostras previne o crescimento microbiano e a degradação de algumas proteínas. (Chiappin et al., 2007).

A análise do fluído salivar com o objetivo de validar técnicas de identificação e doseamento de biomarcadores com valor de diagnóstico tem sido alvo de investigação nos últimos anos (Malon et al, 2014; Malathi et al., 2014,).

O objetivo desta monografia é reunir informação atual que permita saber qual é a aplicação atual de biossensores salivares no diagnóstico e monitorização do cancro, diabetes, VIH e hepatites e quais as suas aplicações no sector farmacêutico.

Metodologia de pesquisa

Esta monografia assenta em revisão bibliográfica atual com base em artigos científicos.

A metodologia de pesquisa usada para a elaboração desta monografia consistiu na pesquisa de termos como “*cancer biomarkers*”, “*cancer biossensor*”, “*diabetes*”, “*diabetes biossensor*”, “*HIV*”, “*HIV diagnosis*”, “*HIV biossensor*”, “*hepatitis*”, “*hepatitis diagnosis*”, “*hepatitis biossensor*”, cruzados com “*saliva*” na base de dados *on-line PubMed* durante o período entre Janeiro e Setembro de 2015.

Foram revistos artigos que tivessem sido publicados preferencialmente entre os anos de 2000 a 2015, com exceção de alguns artigos mais antigos com o fim de explicar algumas descobertas iniciais.

Os dados de epidemiologia foram retirados do *site* da internet da FDA, INFARMED, DGS e INE.

Para organização e gestão de citações e referências bibliográficas foi utilizado o programa *Mendeley Desktop*[®], versão 1.13.8.

Estado da Arte

Biossensores são pequenos dispositivos que permitem detetar e quantificar componentes biológicos, denominados por analitos, como diversos tipos de proteínas, enzimas ou anticorpos. Têm por base um transformador de sinal (ótico, eletroquímico, etc.) para que se possa quantificar o sinal e posteriormente com a ajuda de *software* se possa obter o resultado. (Malon, Sadir, Balakrishnan, & Córcoles, 2014)

As moléculas detetadas pelos biossensores são chamados de biomarcadores e caracterizam-se por moléculas que indicam uma alteração do estado fisiológico do indivíduo, sendo assim utilizados para o diagnóstico ou monitorização de doenças. (Maes et al., 2015)

Atualmente existe um grande investimento nesta área de investigação apresentando-se nesta monografia especificamente o estado da arte para biossensores salivares no diagnóstico e monitorização de 4 patologias relevantes na saúde: cancro, diabetes, VIH e hepatites.

1. Biossensores tumorais

O cancro caracteriza-se, de forma geral, por um crescimento anormal e não controlado de células. É uma doença com uma elevada prevalência na população mundial. Estima-se que em 2015 surjam 1 658 370 novos casos de cancro em todo o mundo. (American Cancer Society, 2015) Esta patologia é a segunda causa de morte em Portugal, com uma taxa de mortalidade padronizada por tumores malignos de 212,2 por 100 000 habitantes em 2012 em Portugal Continental. (DGS, 2014)

O cancro é diagnosticado através de análises a fluidos corporais, utilizando marcadores tumorais e de imagens como ressonâncias magnéticas e TAC's (Tomografia Axial Computorizada).

Os marcadores tumorais são pesquisados para diagnóstico, prognóstico, seleção de tratamento e monitorização da doença. Existem até ao momento diversos marcadores tumorais descritos mas poucos são utilizados na prática clínica. Os marcadores aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) encontram-se na tabela 1.

Tabela 1: Marcadores tumorais aprovados pela FDA – adaptada de (Ricardo, Almeida, Pedrosa, Leite, & Ribeiro, 2007)

Patologia	Biomarcadores	Fluído
Cancro dos testículos	Alfafetoproteína; Gonadotrofina coriônica humana	Sangue
Cancro do pâncreas	CA 19-9	Sangue
Cancro dos ovários	HE4; ROMA; OVA1; CA 125	Sangue
Cancro do colon	CEA	Sangue
	Recetor do fator de crescimento epidérmico (HER-1)	Tecido
Cancro colon-rectal	Fibrina/FDP	Sangue; Urina
Cancro da Bexiga		
Cancro da tiróide	Tireoglobulina	Sangue
Cancro da próstata	PSA; Pro2PSA	Sangue
	Proteína p63	Sangue; Tecido
Cancro da mama	CA 15.3; CA 27-29	Sangue
	HER2/neu	Sangue; Tecido
	Recetor de estrogénio; citoqueratina; Recetor de progesterona	Tecido
Cancro da bexiga	NMP22; BTA	Urina
Cancro gastrointestinal	C-KIT (CD 117)	Tecido

O investimento científico nos últimos anos tem sido significativo na investigação de marcadores tumorais na saliva tendo como principais objetivos:

- a) Determinar se os marcadores tumorais já conhecidos atravessam do sangue ou dos tecidos afetados para a saliva;
- b) Detetar correlação entre a sua presença na saliva e a doença ou descobrir outros que ainda não tenham sido descritos;
- c) Tornar as análises mais fáceis e menos onerosas para o doente.

Esta investigação não assenta só na facilidade do diagnóstico mas também na monitorização do tratamento e no controlo de eventuais recidivas.

Os estudos têm-se baseado não só nos marcadores tumorais aprovados pela FDA mas também noutros que têm emergido.

1.1. Cancro da mama

O cancro da mama é o cancro com maior incidência em Portugal, com uma taxa de incidência de 57,94 por 100000 habitantes, em 2009.(DGS, 2014)

Tendo por base este cancro, foram feitos estudos em que se encontrou evidência da presença de alguns destes marcadores na saliva e foi concluído da sua utilidade para o diagnóstico, monitorização da terapêutica e controlo de recidivas. Como (Streckfus, Bigler, Dellinger, et al., 2000) demonstrou, pela primeira vez, é possível recolher da saliva de mulheres diagnosticadas com carcinoma mamário, 3 marcadores tumorais: o antígeno **CA 15-3**, a proteína **erb** e o gene **p53**.

O antígeno **CA 15.3** é produzido pelas células epiteliais glandulares. Este antígeno é utilizado para a monitorização da terapêutica e diagnóstico precoce de uma recidiva de cancro da mama. (Ricardo et al., 2007) A pesquisa e quantificação deste antígeno foi feita tendo por base um ensaio enzimático ELISA utilizando peroxidase de rábano para medir a fluorescência a 490nm utilizando um espectrómetro e a concentração foi expressa em U/mg de proteína (Streckfus, Bigler, Dellinger, et al., 2000). O estudo de Agha-Hosseini, Mirzaii-Dizgah, e Rahimi, (2009), também sugeriu que a quantificação deste biomarcador na saliva pode ser uma importante ferramenta no que diz respeito ao diagnóstico e monitorização deste tipo de neoplasia, uma vez revelou uma correlação positiva entre o valor de quantificação do antígeno do sangue e na saliva de doentes com esta patologia.

A **erb** ou **c-erbB-2** ou **HER2/neu** é uma proteína testada como marcador tumoral para definir o prognóstico para o cancro da mama(Ross & Fletcher, 1998).

O **p53** é um gene supressor de tumor que é pesquisado para saber qual a predisposição da pessoa para o cancro da mama (Streckfus, Bigler, Tucci, & Thigpen, 2000)

Estes dois marcadores (**erb** e **p53**) foram testados de igual maneira. Foi feito um ensaio enzimático ELISA e foi seguidamente medida a intensidade da coloração emitida a 490nm. As medidas utilizadas foram U/mg de proteína para o **erb** e pmol/mg de proteína para o **p53**. Estes marcadores e o **CA 15.3** mostraram ser fiáveis para diagnóstico inicial, sempre acompanhado de exame médico e mamografia, e para monitorização posterior (Streckfus, Bigler, Tucci, et al., 2000)

1.2. Cancro do pâncreas

Ao contrário do cancro da mama, a investigação de biomarcadores para o cancro do pâncreas ainda está numa fase inicial.

O cancro do pâncreas tem sido alvo de vários estudos, no que diz respeito ao seu diagnóstico precoce, uma vez que as ferramentas existentes até ao momento apenas permitem um diagnóstico tardio onde o doente não tem um bom prognóstico. Este cancro é principalmente diagnosticado pela pesquisa do antígeno **C19-9**. Este antígeno também conhecido por antígeno de Lewis, é um antígeno que existe à superfície das células cancerígenas e que entra posteriormente na corrente sanguínea e tem como valor normal 37 U/mL. Este marcador serve principalmente para fazer a monitorização do tratamento do cancro do pâncreas apesar de também servir para fazer o diagnóstico de cancros do fígado, vesícula biliar e colo-rectal mas com menor especificidade (Ricardo et al., 2007). Este biomarcador tem pouca sensibilidade e especificidade para distinguir células malignas no pâncreas de tumores benignos ou de casos de pancreatites crónicas além de que o seu valor pode aparecer aumentado em casos de cancro do esófago, estomago ou mesmo insuficiência renal. Por isso a investigação passou a focar-se noutro tipo de biomarcadores (Xie et al., 2014).

A investigação para novos biomarcadores para o diagnóstico de cancro do pâncreas, e consequentemente, a utilização de saliva neste diagnóstico tem seguido o processo de pesquisa a todos os biomarcadores que se encontrem na saliva de doentes com carcinoma do pâncreas em comparação com a população-controlo, e tentar assim encontrar substratos que estejam a ser produzidos e se encontrem nestes doentes.

Uma das abordagens recentes foi a pesquisa de biomarcadores transcriptómicos, comparando-se os que se encontravam na saliva de pessoas diagnosticadas com cancro do pâncreas e da população-controlo saudável. O estudo de Zhang et al. (2010) focou-se na pesquisa de 4 biomarcadores em simultâneo para aumentar a sensibilidade e especificidade, e assim testar um diagnóstico mais precoce da doença. Os biomarcadores específicos escolhidos foram MBD3L2, o GLTSCR2, o TPT1 e o KRAS.

Outra abordagem que tem sido investigada é a quantificação de micro-RNAs específicos da neoplasia. Um estudo investigou o perfil dos miR-369-5p e miR-940 e conclui-se que a sua concentração era muito superior quando o indivíduo tinha cancro do pâncreas em

comparação com indivíduos com tumores benignos, pancreatites crônicas e em indivíduos saudáveis (Xie et al., 2014).

Outro estudo mais recente pesquisou os micro-RNA presentes na saliva de doentes com cancro do pâncreas, pancreatite aguda e indivíduos saudáveis e foram capazes de determinar que nos indivíduos com carcinoma do pâncreas 3 RNAmi estavam presentes: hsa-miR-21; hsa-miR-23a e hsa-miR-23b. Descobriu-se também que nos indivíduos que tinham pancreatite aguda era detectado o hsa-miR-210 (Humeau et al., 2015)

Neste tipo de carcinoma, a investigação está focada apenas na descoberta de biomarcadores que possam ser utilizados para diagnóstico precoce, para diminuir a mortalidade desta doença, bem como na pesquisa destes biomarcadores na saliva para uma colheita mais fácil e confortável para o doente. Ainda não existe evidência de biossensores específicos para o cancro do pâncreas.

1.3. Cancro da cabeça

O cancro da cabeça incorpora cancros da cavidade oral, faringe, laringe e seios faciais. Estes tipos de cancro têm sido os mais estudados no que diz respeito a biomarcadores salivares uma vez que as análises a este fluido para este tipo de neoplasias é muitas vezes considerado um exame local e não levanta as dúvidas de utilizar a saliva para fazer análises a doenças sistémicas (Guerra et al., 2015)

Os biomarcadores que têm sido mais estudados para este tipo de carcinoma são: IL-8 ((St John et al., 2004); (Hu et al., 2007)), colina (Wang, Gao, Wang, & Duan, 2014a), ácido pipicolínico (Wang et al., 2014a), L-fenilalanina ((Wang, Gao, Cheng, Wang, & Duan, 2013)) e S-carboximetil-L-cisteína. (Wang et al., 2014)

A interleucina 8, IL-8, é uma citocina, proteína intracelular que tem funções na regulação e proliferação das células. Este biomarcador é um pouco controverso uma vez que as citocinas estão presentes também quando há processos inflamatórios ou mesmo diabetes o que faz com que este tipo de marcador não seja muito específico (St John et al., 2004).

Foi já desenvolvido um biossensor usando a IL-8 como substrato para o cancro da cabeça. Este biossensor é capaz de apresentar resultados com amostras pequenas o que faz com que seja utilizável pela saliva. O procedimento é semelhante a um ELISA mas sem ser necessário a amplificação enzimática. O seu uso está comprometido pois apresenta mais falsos negativos que o teste de referência. Os investigadores sugerem o desenvolvimento

de um biossensor que consiga fazer a quantificação de mais de um biomarcador para aumentar a sensibilidade e especificidade (Tan et al., 2008).

A colina é um metabolito usado na síntese de células, de acetilcisteína e na metilação do ADN. Este metabolito é utilizado como biomarcador tumoral uma vez que a sua presença indica um aumento na proliferação das células (Wang et al., 2014a)

O ácido pipecolínico, é um aminoácido cíclico que é produzido pela degradação da lisina que, apesar de não se conhecer o processo pelo qual este biomarcador é produzido neste tipo de patologia, foi encontrado em elevadas concentrações em doentes com cancro da boca nos primeiros estádios (Wang et al., 2014a)

A L-fenilalanina, precursor da tirosina, tem sido considerado um biomarcador tumoral quando a sua concentração está baixa uma vez que indica um maior gasto de energia pela anormal proliferação celular que acontece no cancro. Foi investigado um método de pesquisa deste marcador (UPLC–ESI–MS/MS) que permitia a sua quantificação em 10 minutos (Wang et al., 2013).

O S-carboximetil-L-cisteína tem sido indicado como um biomarcador para cancro oral, para qualquer fase da doença, mas os autores sugerem mais investigação, principalmente com um maior número de doentes para que se possa tirar uma informação mais fidedigna (Wang et al., 2014a).

O cancro da cabeça, ao envolver muitos tipos diferentes de cancro, como já foi descrito, não tem ainda desenvolvido um biossensor que possa, com a melhor especificidade e sensibilidade, permitir o diagnóstico destes tipos de patologias.

1.4.Cancro do pulmão

O cancro do pulmão, à semelhança do cancro do pâncreas, conta com um diagnóstico muito tardio que se baseia principalmente em TAC's e raio-x ao tórax. Existem alguns biomarcadores já investigados pesquisados, principalmente no sangue e em exsudados brônquicos. Esses biomarcadores são: CA-125, CA 19-9, CA 15-3, CEA, SCC, CYFRA 21-1 e NSE. Muitos destes biomarcadores são principalmente usados para o diagnóstico de outras patologias mas existe evidência de estarem presentes quando existe um carcinoma de pulmão o que traz vários problemas ao nível da especificidade dos marcadores (Zhang et al., 2012)

O CA 125 é um antígeno que é utilizado principalmente para fazer a monitorização do tratamento e para a deteção precoce de recaídas de cancro do ovário e em como valor normal 35 U/mL (Ricardo et al., 2007).

O CA 19-9 ou antígeno de Lewis foi descrito anteriormente uma vez que é principalmente usado para o diagnóstico do cancro do pâncreas, tal como o antígeno CA 15-3 que é utilizado para diagnóstico precoce do cancro da mama (Ricardo et al., 2007).

O CEA, também conhecido como antígeno carcinoembrionário, é produzido pelas células da mucosa gastrointestinal e é utilizado para o diagnóstico e monitorização da terapêutica para cancro do colon. O seu valor normal é de 3,5 ng/mL para não fumadores e de 7 ng/mL para fumadores (Ricardo et al., 2007).

O SCC (Arellano-Garcia et al., 2008), o CYFRA 21-1 (Zhong et al., 2007) e o NSE são marcadores que tem sido investigado em diferentes tipos de cancro do pulmão, cada um deles específico para um tipo diferente mas os estudos indicam que devem ser testados os 3 ao mesmo tempo para aumentar a sensibilidade (Molina et al., 2009).

Recentemente o estudo de Zhang et al., (2012) pesquisou biomarcadores transcriptómicos na saliva de doentes com cancro do pulmão quando comparados com o grupo-controlo. Foram descritos sete biomarcadores (EGFR, BRAF, FGF19, FRS2, CCNI, GREB1 e LZTS1). Este estudo também investigou se o facto de uma pessoa ser fumadora interfere na pesquisa de biomarcadores salivares para o cancro do pulmão. Conclui-se que nos indivíduos fumadores mas sem qualquer vestígio de cancro de pulmão era possível encontrar o biomarcador CCNI na saliva mas nenhum dos outros biomarcadores; nos indivíduos com cancro de pulmão e não-fumadores era possível não encontrar níveis aumentados dos 7 biomarcadores na saliva (apenas do BRAF, EGFR; LZTS1 e FGF19) mas em doentes fumadores os 7 tinham valores acima do normal. Este estudo sugere um diagnóstico que se baseie na pesquisa de vários biomarcadores ao mesmo tempo para aumentar a sensibilidade e especificidade.

Alguns dos biomarcadores especificados anteriormente foram já alvo de outros estudos que comprovam a especificidade e sensibilidade dos mesmos para o cancro do pulmão. (Desnoyers et al., 2008; Nonaka et al., 2005; Pao & Girard, 2011; Wei et al., 2014).

Outra abordagem que tem sido estudada para o diagnóstico do cancro do pulmão através da saliva é quantificação de ELM's, vesículas lipídicas produzidas por células

cancerígenas e que tem como função a proteção da célula cancerígena e o transporte de moléculas específicas do tumor para o sangue e consequentemente para outros fluidos corporais. Esta abordagem é recente e ainda não existe muita informação sobre a forma como estas vesículas passam para a saliva e quais as melhores técnicas laboratoriais para a sua quantificação, sendo assim necessário mais estudos (Yang, Wei, Schafer, & Wong, 2014)

O cancro do pulmão, à semelhança do cancro do pâncreas, está ainda numa fase muito precoce da sua investigação. De momento, foca-se apenas na pesquisa de biomarcadores que permitam fazer o diagnóstico precoce de uma forma rigorosa, segura e confortável não tendo ainda sido desenvolvidos biossensores salivares.

1.5.Cancro do Ovário

O cancro do ovário apresenta uma grande prevalência em Portugal, com uma taxa de incidência, em 2009, de 13,18 por 100 000 habitantes para o cancro do corpo do útero e de 13,3 para o cancro do colo do útero (DGS, 2014)

O diagnóstico desta patologia tem-se baseado em biomarcadores sanguíneos como é o caso do antígeno CA 125, CA15.3, CA19-9, CA72-4 e OVA-1 (Y. H. Lee, Kim, Zhou, Kim, & Wong, 2012)

Os antígenos CA 125 e o CA 15.3 foram já definidos no capítulo do cancro da mama.

O antígeno CA19 e o antígeno CA72-4 foram descritos como possíveis biomarcadores tumorais para o cancro do ovário mas como podem ser encontrados noutros tipos de neoplasia são considerados pouco específicos.

O OVA1 é um teste onde se procura 5 proteínas diferentes (CA 125 II, pré-albumina, apolipoproteína A1, β 2-microglobulina e a transferrina) para fazer um exame mais precoce ao cancro dos ovários (Abraham, 2010)

O estudo de Lee et al., (2012) pesquisou o perfil transcriptómico da saliva de doentes com cancro do ovário. Os investigadores observaram que nestes indivíduos apareciam 7 micro-ARN's (H3F3A, SRGN, B2M, BASP1, AGPAT1, IL1B e IER3)

A investigação de biomarcadores tumorais para este tipo de neoplasia encontra-se numa fase inicial existindo, por isso, poucas evidências da presença destes biomarcadores na

saliva o que implica que ainda não exista um desenvolvimento efetivo de biossensores específicos.

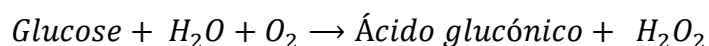
2. Biossensores da Diabetes

Diabetes Mellitus caracteriza-se por uma alteração metabólica que compromete a regulação dos valores de glucose no sangue o que se traduz por uma hiperglicemia ou hipoglicémia do indivíduo. A etiologia desta alteração tem origem na não produção de insulina pelas células β do pâncreas ou pela dificuldade desta poder ser utilizada pelas células periféricas. Esta doença tem complicações a nível sistémico comprometendo diversos órgãos como o olho, o rim e o coração.

Diabetes Mellitus é uma das doenças crónicas com maior prevalência no mundo e com tendência a aumentar. A OMS prevê que até 2020 a prevalência desta doença chegue aos 171 milhões de pessoas e que esse valor aumente para os 366 milhões de pessoas até ao ano de 2030 (OMS, 2006)

Esta doença depende da colheita de sangue várias vezes por dia para a monitorização dos valores de glucose. Este procedimento causa ansiedade e desconforto físico e psicológico ao doente o que leva muitas vezes a uma diminuição da adesão à monitorização constante e à terapêutica. Por isso, há muito tempo que os investigadores têm tentado encontrar uma forma mais confortável dos doentes poderem fazer o controlo dos seus níveis de glucose. Uma das possibilidades que tem sido investigadas é a utilização de saliva uma vez que é de fácil recolha pelo doente e confortável (Panchbhai, 2012)

A abordagem utilizada para a quantificação de glucose a partir da saliva tem sido a quantificação de oxigénio, com o auxílio de um eléctrodo, consumido na reação catalisada pela glucose-oxigenase que transforma uma molécula de glucose numa molécula de ácido glucónico, cuja reação química é a seguinte (Malon et al., 2014):



Existe também um método alternativo que consiste em quantificar o peróxido de oxigénio produzido pela mesma reação, também com um eléctrodo específico (Malon et al., 2014).

A relação entre a glucose medida no sangue e a glucose medida na saliva é um assunto muito controverso. Vários estudos não evidenciam esta relação como é o caso do estudo de Forbat, Collins, Maskell, e Sönksen, (1981). Outros estudos sugerem que a concentração de glucose na saliva está aumentada dos indivíduos diabéticos mas que não é possível servirmo-nos deste fluido para a monitorização da doença uma vez que estes indivíduos apresentam uma diminuição da secreção de saliva em cerca de 45-50% podendo assim alterar a sua composição (Vasconcelos, Soares, Almeida, & Soares, 2010)

No entanto existem estudos mais recentes que apontam para este claro aumento da concentração de glucose na saliva, tal como o estudo anterior, mas rejeitam pôr de parte esta abordagem para monitorização de diabetes, apenas assumindo que são necessários mais estudos para se poder fazer a correlação direta entre os valores das concentrações nos dois fluidos. (Aydin, 2007; Mascarenhas, Fatela, & Barahona, 2014; Satish et al., 2014, Indira et al., 2015).

Apesar destes resultados promissores ainda não existe nenhum biossensor desenvolvido para a quantificação de glucose e consequente monitorização da *Diabetes Mellitus*.

3. Biomarcadores para VIH

O VIH, também chamado vírus de imunodeficiência humana, é uma problemática mundial. Em Portugal estima-se que, em 2012, existiam cerca de 42 580 pessoas infetadas, apesar de o número de novos diagnósticos tenha vindo a diminuir desde o ano de 2000 (DGS, 2013).

Classicamente, o diagnóstico de VIH pode ser feito por métodos serológicos (ELISA, quantificação do antígeno VIH ou Western Blot) ou por métodos de biologia molecular (PCR, quantificação do ARN do vírus) (Im, Kim, & Oh, 2011).

O diagnóstico desta infeção, em Portugal, seguindo a norma 058/2013 da Direção Geral de Saúde, é feito através da pesquisa de anticorpos anti-HIV1, anti-HIV2 e do antígeno p24, no soro do indivíduo. Este procedimento já foi aperfeiçoado, apresentando-se no momento, na 4ª geração de testes, o que faz com que sejam testes com elevada especificidade e sensibilidade (DGS, 2013).

Segundo esta norma este diagnóstico segue um algoritmo muito específico. Se o soro do indivíduo for reativo para qualquer dos substratos, este teste deve ser repetido e se se continuar a verificar a reação então a pessoa será positivo para VIH1 ou VIH2 ou se tiver os dois tipos de anticorpos é denominado de VIH positivo e a pessoa deve ser encaminhada para o hospital para uma consulta específica. Se não for reativo para nenhum dos anticorpos ou para o antígeno então a pessoa não está infetada e é denominada de VIH negativo.

Existem já biossensores salivares para o VIH aprovados pela FDA e em Portugal a INFARMED já reconheceu alguns destes biossensores. A análise salivar torna-se vantajosa nesta patologia, em particular, uma vez que diminui o perigo de contaminação do profissional de saúde aquando da colheita e análise do fluido dado que existe evidência científica, que a carga viral encontrada na saliva é muito mais baixa que a sanguínea.

Existem diversos biossensores salivares desenvolvidos neste âmbito. O mais conhecido é da marca OraQuick®. Este sensor foi inicialmente desenvolvido para testes serológicos rápidos para HIV-1 mas em 2004, a FDA aprovou a utilização do biossensor salivar para o diagnóstico de VIH-1 (FDA, 2004) e em 2012 aprovou um biossensor salivar para o diagnóstico de VIH-1 e VIH-2 para uso individual que é vendido sem receita médica.

(FDA, 2012). O teste é feito esfregando as gengivas, tendo atenção para não tocar no interior da bochecha, céu-da-boca ou língua, com a patilha do sensor. De seguida deve-se mergulhar a patilha na solução reveladora que vem com o *kit* e esperar 20 minutos. O resultado do teste baseia-se na leitura de linhas vermelhas, como teste de gravidez, em que 2 linhas correspondem a um teste positivo (Im et al., 2011).

O biossensor é de fácil manuseamento e utilização e provou ter uma sensibilidade de 96% e uma especificidade de 100%(Connell et al., 2003)

Este biossensor já foi testado e aprovado noutros países como a Coreia (Im et al., 2011), Moçambique (Sema Baltazar et al., 2014), Zâmbia (Zachary et al., 2012), Perú (Nelson et al., 2012) e na Austrália (Chan et al., 2015).

Em Portugal, saiu no Decreto-Lei n.º 145/2009, de 17 de Junho, quais os Dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro* registados no INFARMED para serem utilizados como testes rápidos para o VIH. O OraQuick® foi um dos mencionados. Um dos pontos do decreto-lei, que difere de outros países, é que em Portugal estes testes rápidos destinam-se somente a ser utilizados por profissionais de saúde, sendo assim “proibida a disponibilização diretamente ao público dos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro* destinados unicamente ou principalmente à deteção, confirmação e quantificação de marcadores de infeção por VIH (...)”.

Para esta doença encontra-se já um biossensor desenvolvido e acreditado pelo INFARMED. Encontram-se em estudo outros biossensores como é o caso do Reveal, do UniGol e do Multispot. Estes biossensores neste momento só são utilizados com sangue ou soro e não estão ainda desenvolvidos para análise em saliva.

O uso do OraQuick® permite um diagnóstico rápido e confortável para o VIH fomentando o controlo desta doença. A sua utilização ao nível da farmácia comunitária pode contribuir para uma maior adesão ao diagnóstico desta doença uma vez que é um local com uma menor possível conotação negativa como locais especializados para este diagnóstico. Este biossensor dá também a possibilidade de testes em pouco tempo, beneficiando assim o utente que não tem que esperar tanto tempo pelos resultados.

Biomarcadores para Hepatite

3.1.Hepatite A

A hepatite A é uma doença provocada por um vírus e que tem uma prevalência de 1,5 milhões de casos por ano, mundialmente (Vaughan et al., 2014)

O vírus da hepatite A é um vírus ARN, único vírus do género *Hepatovirus*, e a sua transmissão é feita pela via oral-fecal, isto é, consumo de água ou alimentos infetados com matéria fecal. Este vírus está associado a países com défice de recursos na sanitização (Vaughan et al., 2014)

O diagnóstico de hepatite A é feito ou pela pesquisa serológica de ARN viral, durante o período de incubação do vírus (Amado, Villar, de Paula, & Gaspar, 2008); ou pela pesquisa de anticorpos anti-VHA IgM durante a fase aguda da doença ou IgG na fase de convalescença (Tourinho et al., 2011)

Existem estudos que se dedicaram à pesquisa e quantificação de ARN viral na saliva, com ajuda de PCR, de forma a validar a saliva como meio de diagnóstico (Amado et al., 2008; Joshi, Bhalla, Kalrao, Dhongade, & Chitambar, 2014). Estes estudos apresentaram como maior dificuldade a extração do material biológico da amostra, devido à reduzida quantidade deste material na saliva e à presença de substâncias inibitórias. Apesar destas dificuldades foi possível o desenvolvimento de um método de quantificação de ARN viral na saliva, com o auxílio de PCR em tempo real (Amado et al., 2008). No entanto o estudo de Joshi et al., (2014) põe em causa o uso da saliva para a quantificação do ARN viral uma vez que em apenas 8,7% dos doentes era possível fazer-se esta quantificação.

Os estudos que tiveram como objetivo a quantificação dos anticorpos específicos do vírus na saliva testaram inicialmente os métodos já certificados para a análise serológica mas verificaram que a sensibilidade era muito baixa. Foram então desenvolvidos diferentes métodos com o objetivo de aumentar a sensibilidade dos testes e tornar a saliva um fluido credível para este tipo de análise. O estudo Tourinho et al., (2011) desenvolveu um ensaio imunoenzimático ELISA competitivo. Este método demonstrou que o uso de saliva apresentava uma sensibilidade superior aos exames serológicos sugerindo que a utilização de saliva seria melhor que as análises tradicionais.

3.2.Hepatite B

A hepatite B é uma doença produzida por um vírus ADN da família *Hepadnaviridae* e as formas de contágio mais comuns são transmissão vertical, relações sexuais ou utilização de seringas e agulhas infetadas. Existe já vacina para este vírus mas apesar disso calcula-se que, em todo o mundo, estejam infetadas mais de 350 milhões de pessoas(Kidd-Ljunggren, Holmberg, Bläckberg, & Lindqvist, 2006)

O diagnóstico desta doença tem sido feito pela pesquisa de anticorpos específicos anti-VHB e pela pesquisa de ADN viral com auxílio da técnica laboratorial PCR. Existe evidência da presença de anticorpos anti-VHB em vários fluidos corporais. Logo, é uma doença que se encontra em estudo para biossensores salivares(Kidd-Ljunggren et al., 2006).

Desde há muito tempo que se estuda a saliva como um potencial alvo para o diagnóstico de hepatite B. O estudo de Thieme, Yoshihara, Piacentini, e Beller, em 1992, estudava já a presença de antígenos específicos, o antígeno de superfície, na saliva de doentes. Este estudo demonstrou na altura que este antígeno era encontrado na saliva e no soro em igual proporção, suportado assim o uso deste fluido corporal para o diagnóstico da doença. Em 2000, Zhevachevsky, Nomokonova, Beklemishev, e Belov, estudaram o diagnóstico de hepatite B analisando a saliva de doentes já diagnosticados e concluíram que era possível encontrar ADN viral e os antígenos HBs e HBe. O estudo de Cruz et al., (2011), estudou a deteção do antígeno de superfície, HBs, na saliva de doentes infetados e a conclusão foi a mesma que estudos anteriores: é possível a utilização da saliva para a deteção de antígenos de superfície do vírus da hepatite B. Outros estudos focaram-se só na deteção de ADN viral na saliva, demonstrando que se encontrava com a mesma ordem de grandeza que no sangue (van der Eijk et al., 2004)

Apesar destes estudos terem sugerido que era possível fazer o diagnóstico de hepatite B através da saliva não têm sido feitos avanços no que diz respeito ao desenvolvimento de biossensores. As análises têm sido feitas utilizando PCR ou testes imunoenzimáticos.

A investigação sobre a hepatite B no que diz respeito à saliva concentra-se, neste momento, na descoberta se a saliva pode ser um meio de contágio.

3.3.Hepatite C

A hepatite C é uma doença com uma elevada prevalência no mundo estimando-se que cerca de 2-3% da população mundial está infetada. Em Portugal estima-se que o número de doentes varie entre os 100.000 a 150.000 mas que apenas 30% estejam diagnosticados (Anjo, Café, Carvalho, & Doroana, 2014).

Esta doença é produzida por um vírus ARN de cadeia simples e conhecem-se até ao momento 6 genótipos, sendo os genótipos 1, 2 e 3 os que estão distribuídos mundialmente e os subtipos 1a e 1b aqueles que são mais prevalentes (Xavier Santos, de Deus, de Almeida Lopes, Duarte Coêlho, & de Castro, 2015).

O diagnóstico clássico de Hepatite C é a pesquisa de anticorpos específicos no sangue.

No que diz respeito à utilização da saliva como meio de diagnóstico foram investigados diferentes marcadores: anticorpos e ARN do vírus. O método mais utilizado é a pesquisa de IgG anti-VHC no sangue, com o auxílio de exames imunoenzimáticos, que podem demorar entre 1 a 2 semanas (Gao et al., 2014). Este tipo de diagnóstico não distingue infeções agudas de crónicas (Smith et al., 2011)

Os estudos que testaram a quantificação de ARN do vírus demonstraram que este método ainda não é considerado um bom meio de diagnóstico uma vez que os valores de concentração na saliva e no sangue não se conseguem correlacionar. No estudo recente de Xavier Santos e colaboradores (2015) verificou-se que em alguns indivíduos a concentração a saliva estava mais elevada levando à suspeita que a saliva pode ser considerada uma via de contaminação. Quando o valor da concentração no sangue foi mais alto sugeriu-se que os valores destas concentrações podem variar conforme o estado de evolução da doença. Dada a variabilidade destes resultados os autores sugerem que são necessários mais estudos para se poder relacionar os dois valores de maneira a se poder utilizar a pesquisa de ARN do vírus para diagnóstico (Xavier Santos et al., 2015)

O biossensor OraQuick® anteriormente referido para o diagnóstico do VIH tem sido também estudado para o diagnóstico da Hepatite C (Cha et al., 2013; Hayes et al., 2014).

Este biossensor foi aprovado pela FDA (FDA, 2010) para a pesquisa de anticorpos anti-VHC através do sangue. Este sensor baseia-se num ensaio imunológico para a deteção qualitativa de anticorpos específicos contra o vírus da Hepatite C e dá resposta em 20-40

minutos. Este sensor apresenta uma sensibilidade que varia entre 97,8-100% e uma especificidade que varia entre 99,5-100%. Sendo ainda possível detectar anticorpos em indivíduos em fase inicial da doença (Gao et al., 2014)

A partir deste biossensor testou-se o diagnóstico utilizando a saliva. Observou-se que este biossensor, apesar de ainda não ter sido aprovado, consegue ser convertido a biossensor salivar utilizando uma amostra pequena (cerca de 5 µL). Apesar dos excelentes resultados que foram descritos houve também uma diferença em sensibilidade. Foram apresentados resultados de falsos negativos quando utilizada a saliva para fazer a análise, em indivíduos que apresentavam uma concentração de IgG baixa na saliva, podendo ser justificada por terapêutica anti-viral específica. Verificou-se ainda que indivíduos que também estavam infectados por VIH também induziam falsos negativos mas não se chegou a nenhuma conclusão quanto a esta interferência (Cha et al., 2013; S. R. Lee et al., 2010).

Existem outros biossensores que têm vindo a ser desenvolvidos e estudados como é o caso do da empresa Cheembio e da empresa MedMira. Estes biossensores utilizam o soro dos indivíduos para o diagnóstico (Smith et al., 2011)

Este tipo de biossensor foi alvo de estudos de preferência nestes doentes e verificou-se que estes preferem uma análise que utilize um biossensor principalmente pela rapidez dos resultados. Assim, este tipo de estudos sugere que a utilização de biossensores pode aumentar a adesão dos indivíduos aos testes de diagnóstico (Hayes et al., 2014)

Apesar de todos estes dados ainda não existe, até ao momento, nenhum biossensor salivar aprovado para o diagnóstico de Hepatite C.

4. Resumo de biomarcadores e respectivos biossensores com aplicação no cancro, Diabetes Mellitus, VIH e Hepatite A, B e C

Muitos avanços têm sido feitos nos últimos anos no que diz respeito ao desenvolvimento de biossensores salivares para o diagnóstico e/ou controlo de doenças com grande interesse para a saúde pública como é o exemplo do cancro, diabetes, VIH e hepatites virais.

Esta monografia revela os principais trabalhos de investigação até Setembro de 2015, descrevendo os biossensores já desenvolvidos e aprovados pelas associações nacionais dos diversos países e problemas que necessitam de ser ultrapassados para o desenvolvimento de outros biossensores.

Na tabela apresentada, tabela 2, encontram-se agrupados por doença os diferentes biomarcadores e os respetivos biossensores que tal como a tabela evidencia, maioritariamente, ainda se encontram em fase de desenvolvimento.

Tabela 2: tabela resumo de biomarcadores e respetivos biossensores com aplicação no cancro, Diabetes Mellitus, VIH e Hepatite A, B e C

	Referência/Ano	Biomarcadores	Amostra	Método de Estudo	Resultados	Biossensor
Cancro da Mama	(Streckfus, Bigler, Tucci, et al., 2000)	CA 15-3; erb; p53 na saliva	mulheres saudáveis (N=21)	Ensaio enzimático ELISA (490nm)	Presente na saliva para diagnóstico inicial; Confirmar com exame físico	Não desenvolvido
	(Agha-Hosseini et al., 2009)	CA 15-3 na saliva e no sangue	- Doentes com cancro da mama (N=26) - Controlos (N=35)	Ensaio enzimático	Correlação positiva entre os dois valores.	Não desenvolvido
Cancro do Pâncreas	(Zhang et al., 2010)	Biomarcadores transcriptómicos (MBD3L2, GLTSCR2, TPT1 e KRAS)	- Controlos (N=30) - doentes com cancro do pulmão (N=30) - doentes com pancreatite aguda (N=30)	Perfil transcriptómico	Bom para diagnósticos precoces	Não desenvolvido
	(Xie et al., 2014)	Micro-ARN's (miR-369-5b e miR-940)	- Doentes com cancro do pulmão (N=48) - Doentes com traumas no pâncreas (N=20)	PCR	Bom para distinguir tumores malignos de benignos e de outras doenças do pâncreas.	Não desenvolvido
	(Humeau et al., 2015)	micro-ARN's	- Doentes com Cancro do pâncreas (N=7) - Doentes com pancreatite (N=4) - Controlos (N=4) - IPMN (n=2)	PCR	Detectados hsa-miR-21; hsa-miR-23a e hsa-miR-23b; Em casos de pancreatite aguda deteta-se hsa-miR-210	Não desenvolvido
Cancro da Cabeça	(Tan et al., 2008)	IL-8	N=20	ELISA	Valores mais baixos que o método usado	Desenvolvido mas ainda com limitações
	(Wang et al., 2014a)	Colina, ácido pipecolínico, L-carnitina e betaina	Doentes com cancro da cabeça (N=30)	Biomarcadores separados por cromatografia em coluna	Os 4 marcadores apresentam valores de concentrações alterados aquando um carcinoma da cabeça. Mecanismo desconhecido	Não desenvolvido

	Referência/Ano	Biomarcadores	Amostra	Método de Estudo	Resultados	Biossensor
Cancro da Cabeça (continuação)	(Wang et al., 2013)	L-fenilalanina e L-leucina	Doentes diagnosticados; • Estadio I (N=7) • Estadio II (N=6) • Estadio III (N=2) • Estadio IV (N=15)	UPLC–ESI-MS	Quantificação dos 2 marcadores estudados levam a uma especificidade de 91,7% e sensibilidade de 92,3%	Não desenvolvido
	(Wang, Gao, Wang, & Duan, 2014b)	Ácido láctico, Ácido hidroxifenilactico, N-nonanoiclicina, 5-Hidroximetiluracilo, Ácido succínico, Ornitina, Hexanoilcarnitina, Propionilcolina, Carnitina, Ácido 4-hydroxi-L-glutâmico, Acetilfenilalanina, esfinganina, fitoesfingosina, S-carboximetil-L-cisteína	• Estadio I (N=4) • Estadio II (N=9) • Estadio III (N=3) • Estadio IV (N=14)	Foram separados por cromatografia potenciais marcadores	14 Substratos com potencial para marcadores tumorais	Não desenvolvido
Cancro do pulmão	(Zhang et al., 2012)	BRAF, CCNI, EGFR, FGF19, FRS2, GREB1 e LZTS1	• Doentes (N=42) • Controlos (N=74)	Perfis transcricionais	EGFR, BRAF, FGF19, FRS2, CCNI, GREB1 e LZTS1	Não desenvolvido
	(Nonaka et al., 2005)	FEZ1	• Doentes (N=100)	Imunoenzimáticos	Correlação positiva entre a perda de expressão de FEZ1 e a evolução do tumor	Não desenvolvido
	(Wei et al., 2014)	EGFR	• Doentes com cancro do pulmão (N=22)	Sensor eletroquímico que deteta mutações em diferentes fluidos corporais	O sensor EFIRM é capaz de detetar mutações específicas que podem estar relacionadas com o cancro do pulmão	EFIRM

	Referência/Ano	Biomarcadores	Amostra	Método de Estudo	Resultados	Biossensor
Cancro do pulmão	(Yang et al., 2014)	ELM's	(N=3000)	Western Blot, RT-PCR	É possível encontrar ELM's na saliva de doentes com cancro de pulmão	Não desenvolvido
Cancro do Ovário	(Y. H. Lee et al., 2012)	Micro-ARN	- Doentes com cancro do ovário (N=32) - Controlos (N=46)	RT-PCR	H3F3A, SRGN, B2M, BASP1, AGPAT1, IL1B e IER3	Não desenvolvido
Diabetes	(Forbat et al., 1981)	Glucose	Doentes com Diabetes (N=31)	Método da glucose oxidase	Não existe correlação entre a glucose na saliva e no sangue	Não desenvolvido
	(Vasconcelos et al., 2010)	Glucose	- Doentes (N=40) - Controlos (N=40)	Medição da glucose na saliva a 500nm; Medição no sangue utilizando biossensor OneTouch	Alguns indivíduos apresentavam valores aumentados de glucose na saliva, outros diminuídos	Não desenvolvido
	(Aydin, 2007)	Glucose e alfa-amilase	- Doentes (N=40) - Controlos (N=22)	Medição com radiações γ	Glucose na saliva é mais elevada em diabéticos mas não se encontra correlação com os valores no sangue	Não desenvolvido
	(Satish et al., 2014)	Glucose	- Doentes (N=20) - Controlos (N=10)	Estimulação da glucose	Glucose na saliva é mais elevada em diabéticos mas não se encontra correlação com os valores no sangue	Não desenvolvido

	Referência/Ano	Biomarcadores	• Amostra	Método de Estudo	Resultados	Biossensor
Diabetes (continuação)	(Mascarenhas et al., 2014)	Glucose	• Diabéticos (N=45) • Controlos (N=16)	Kit colorimétrico para deteção da glucose	Glucose na saliva é mais elevada em diabéticos mas não se encontra correlação com os valores no sangue	Não desenvolvido
	(Indira et al., 2015)	Glucose	• Diabéticos (N=40) • Controlos (N=40)	Método da glucose oxidase	Glucose na saliva é mais elevada em diabéticos mas não se encontra correlação com os valores no sangue	Não desenvolvido
VIH	(Connell et al., 2003)	IgG	• Doentes (N=101) • Controlos (N=100)	Utilizar biossensor já desenvolvido	Sensibilidade: 96% Especificidade: 100%	OraQuick
	(Sema Baltazar et al., 2014)	Anticorpos anti-VIH	• (N=1620)	Utilizar biossensor já desenvolvido	Sensibilidade: 99,8% Especificidade: 99,8%	OraQuick
	(Zachary et al., 2012)	Anticorpos anti-VIH	• (N=4458)	Utilizar biossensor já desenvolvido	Sensibilidade: 98,7% Especificidade: 99,8%	OraQuick
	(Nelson et al., 2012)	Anticorpos anti-VIH	• (N=102)	Utilizar biossensor já desenvolvido	Doentes com tuberculose aceitavam mais fazer o teste para deteção de VIH utilizando o biossensor salivar	OraQuick

	Referência/Ano	Biomarcadores	Amostra	Método de Estudo	Resultados	Biossensor
VIH (continuação)	(Chan et al., 2015)	Anticorpos anti-VIH	(N=1074)	Utilizar biossensor já desenvolvido	Sensibilidade: 84,6% Especificidade: 99,8%	OraQuick
Hepatite A	(Amado et al., 2008)	ARN viral	- Indivíduos saudáveis (N=20) - Indivíduos com marcadores positivos para VHA (N=76)	PCR e PCR em tempo real.	O método desenvolvido com PCR em tempo real apresentou valores de sensibilidade melhores que as análises serológicas	Não desenvolvido
	(Tourinho et al., 2011)	Anticorpos anti-VHA	- Doentes (N=140) - Profissionais de saúde (N=85)	ELISA competitivo	O método desenvolvido utilizando a saliva apresentou valores de sensibilidade melhores que as análises serológicas (91,7% vs 86%)	Não desenvolvido
	(Joshi et al., 2014)	ARN viral.	Crianças (N=70)	RT-PCR	Apenas 8,7% dos doentes apresentavam ARN viral na saliva	Não desenvolvido
Hepatite B	(Thieme et al., 1992)	IgM	Doentes já diagnosticados (N=51)	imunoenzimáticos	Sensibilidade: 100% Especificidade: 100%	Não desenvolvido
	(Cruz et al., 2011)	Antigénio HBs	- Doentes (N=47) - Controlos (N=68)	ELISA	A saliva pode ser utilizada para detetar marcadores do VHB	Não desenvolvido

	Referência/Ano	Biomarcadores	Amostra	Método de Estudo	Resultados	Biossensor
Hepatite C	(S. R. Lee et al., 2010)	IgG anti VHC;	Doentes com medicação (N=19)	OraQuick	Especificidade: 100% Sensibilidade: 99,2%	Biossensor serológico adaptado
	(Cha et al., 2013)	IgG anti VHC;	- Doentes (N=137) - Controlos (N=300)	OraQuick	Especificidade: 100% Sensibilidade: 97,8%	Biossensor serológico adaptado

5. Utilização de biossensores a nível hospitalar e comunitário

O uso de biossensores salivares que permitam um exame rápido mas credível e de segura análise para os profissionais de saúde e confortável para o doente, tem um grande potencial na atividade farmacêutica principalmente na farmácia comunitária.

A farmácia comunitária é um local onde já se faz o controlo e diagnóstico de doenças como infeções urinárias ou controlo de níveis de glicémia, colesterolemia ou tensão arterial.

A existência de biossensores salivares para o controlo da diabetes faria desta análise, muito mais confortável para os doentes, um instrumento com grande adesão para o controlo da glucose, diminuindo assim as consequências a curto e longo prazo desta doença.

A existência de biossensores salivares para o diagnóstico de doenças como o VIH e hepatites virais nas farmácias, sítios onde existe programa de trocas de seringa ou onde pessoas se podem dirigir para realizar os seus programas de substituição de metadona, é uma mais-valia. Estes indivíduos que já depositam confiança nos profissionais de saúde que trabalham nestes estabelecimentos sentem-se mais à vontade para fazerem os respetivos testes a doenças que continuam a ter um estigma negativo na nossa sociedade. Existem já estudos que, após inquiridos a indivíduos com historial de uso de drogas injetáveis, concluíram que estes se sentem mais à vontade a fazer este tipo de análises em sítios onde já se têm que dirigir para fazer a sua troca de seringas do que terem que se dirigir a laboratórios de análises (Smith et al., 2011)

A nível hospitalar, qualquer análise que se faça que não envolva a recolha de sangue mas sim a análise salivar com a mesma sensibilidade e especificada, ajudaria a garantir uma maior segurança para os profissionais de saúde que fazem a recolha e a própria análise, uma vez que diminuiria a probabilidade de contágio e daria um maior conforto ao doente, aumentando a adesão a este tipo de análise a estas doenças que carecem de um diagnóstico precoce para um melhor prognóstico.

Por todos estes motivos, é fundamental a investigação neste ramo para o desenvolvimento de biossensores salivares.

Conclusão

A investigação de biossensores salivares é de extrema importância para a saúde pública. Este tipo de sensores apresentam inúmeras vantagens quer para o doente, como um maior conforto e o custo das mesmas, quer para a população uma vez que a utilização destes sensores pode aumentar a adesão a análises mais simples com vista à obtenção mais fácil de diagnósticos ou permitir que estes sejam feitos mais precocemente aumentando a possibilidade de controlo da doença.

Esta investigação ainda se apresenta em fase inicial para a maior parte das doenças pois é necessário validar esta técnica para os diferentes biomarcadores (esperando-se que igualem ou superem a sensibilidade e especificidade dos métodos até agora utilizados) para posteriormente se poderem desenvolver biossensores específicos.

Neste momento, apenas existem biossensores salivares desenvolvidos, aprovados e já utilizados para a deteção do vírus VIH.

Para outras doenças como a hepatite C, o desenvolvimento destes biossensores parece estar em fases bastante promissoras enquanto para outras doenças como a diabetes ainda existem muitos obstáculos que devem ser ultrapassados para que estes biossensores ofereçam uma análise com toda a credibilidade e segurança para a saúde do doente.

Quanto ao cancro, a investigação encontra-se ainda em fase muito inicial. Tenta-se ainda encontrar biomarcadores para estas doenças que possam ser encontrados na saliva para só depois poderem ser desenvolvidos os biossensores.

Referências bibliográficas

- Abraham, J. (2010). OVA1 test for preoperative assessment of ovarian cancer. *Community Oncology*, 7(6), 249–250.
[http://doi.org/10.1016/S1548-5315\(11\)70565-4](http://doi.org/10.1016/S1548-5315(11)70565-4)
- Agha-Hosseini, F., Mirzaei-Dizgah, I., & Rahimi, A. (2009). Correlation of serum and salivary CA15-3 levels in patients with breast cancer. *Medicina Oral, Patologia Oral Y Cirugia Bucal*, 14(10), 521–524.
<http://doi.org/10.4317/medoral.14.e521>
- Amado, L. a., Villar, L. M., de Paula, V. S., & Gaspar, A. M. C. (2008). Comparison between serum and saliva for the detection of hepatitis A virus RNA. *Journal of Virological Methods*, 148(1-2), 74–80.
<http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.10.020>
- American Cancer Society. (2015). Cancer Facts & Figures 2015.
<http://doi.org/10.3322/caac.21254>
- Anjo, J., Café, a, Carvalho, a, & Doroana, M. (2014). O impacto da hepatite C em Portugal. *GE Jornal Português de ...*, 21(2), 44–54.
<http://doi.org/10.1016/j.jpg.2014.03.001>
- Arellano-Garcia, M. E., Hu, S., Wang, J., Henson, B., Zhou, H., Chia, D., & Wong, D. T. (2008). Multiplexed immunobead-based assay for detection of oral cancer protein biomarkers in saliva. *Oral Diseases*, 14(8), 705–712. <http://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2008.01488.x>
- Aydin, S. (2007). A comparison of ghrelin, glucose, alpha-amylase and protein levels in saliva from diabetics. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 40(1), 29–35.
<http://doi.org/10.5483/BMBRep.2007.40.1.029>
- Balfe, A., & Cannon, D. (2009). *The Biochemistry of Body Fluids*. (P. McGing & R. O’Kelly, Eds.) Association of Clinical Biochemists in Ireland (1.^a ed.).
- Cha, Y. J., Park, Q., Kang, E. S., Yoo, B. C., Park, K. U., Kim, J. W., ... Kim, M. H. (2013). Performance evaluation of the oraquick hepatitis C virus rapid antibody test. *Annals of Laboratory Medicine*, 33(3), 184–189. <http://doi.org/10.3343/alm.2013.33.3.184>

- Chan, D., Stewart, M., Smith, M., Price, T., Lusk, J., Ooi, C., ... Finlayson, R. (2015). The rise of targeted HIV oral rapid testing in Australia. *The Medical Journal of Australia*, 202(5), 251–254.
<http://doi.org/10.5694/mja14.01292>
- Connell, R. J. O., Merritt, T. M., Malia, J. a, Vancott, T. C., Dolan, M. J., Zahwa, H., ... Witt, C. C. De. (2003). Performance of the OraQuick Rapid Antibody Test for Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection in Patients with Various Levels of Exposure to Highly Active Antiretroviral Therapy Performance of the OraQuick Rapid Antibody Test for Diagnosi. *Society*, 41(5), 2153–2155.
<http://doi.org/10.1128/JCM.41.5.2153>
- Cruz, H. M., da Silva, E. F., Villela-Nogueira, C. a., Nabuco, L. C., Rodrigues do Ó, K. M., Lewis-Ximenez, L. L., ... Villar, L. M. (2011). Evaluation of saliva specimens as an alternative sampling method to detect Hepatitis B surface antigen. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 25(January), 134–141. <http://doi.org/10.1002/jcla.20447>
- Decreto-Lei n.o 145/2009, de 17 de Junho (2009).
- Desnoyers, L. R., Pai, R., Ferrando, R. E., Hötzel, K., Le, T., Ross, J., ... French, D. M. (2008). Targeting FGF19 inhibits tumor growth in colon cancer xenograft and FGF19 transgenic hepatocellular carcinoma models. *Oncogene*, 27(1), 85–97.
<http://doi.org/10.1038/sj.onc.1210623>
- DGS. (2013). Relatório do Programa Nacional para a Infecção VIH/SIDA. <http://doi.org/ISSN: 2183-0754>
- DGS. (2014). *Doenças Oncológicas em números – 2014*.
- Food and Drug Administration. FDA Approves First Oral Fluid Based Rapid HIV Test Kit. Bethesda, Maryland: US Department of Health and Human Services; (2004)
<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2004/ucm108272.htm>; visualizado a 20/09/2015 às 18:33
- Food and Drug Administration. OraQuick HCV Rapid Antibody Test. Bethesda, Maryland: US Department of Health and Human Services; (2010)

<http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/Recently-ApprovedDevices/ucm220489.htm>; visualizado a 22/09/2015 às 13:10

Food and Drug Administration. FDA approves first over-the-counter home-use rapid HIV test. Bethesda, Maryland: US Department of Health and Human Services; (2012)

<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm310542.htm>; visualizado a 20/09/2015 às 18:24

Forbat, L. N., Collins, R. E., Maskell, G. K., & Sönksen, P. H. (1981). Glucose concentrations in parotid fluid and venous blood of patients attending a diabetic clinic. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 74(10), 725–728.

Gao, F., Talbot, E. a., Loring, C. H., Power, J. J., Dionne-Odom, J., Alroy-Preis, S., ... Bean, C. L. (2014). Performance of the OraQuick HCV rapid antibody test for screening exposed patients in a hepatitis c outbreak investigation. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7), 2650–2652. <http://doi.org/10.1128/JCM.00132-14>

Guerra, E. N. S., Acevedo, A. C., Leite, A. F., Gozal, D., Chardin, H., & De Luca Canto, G. (2015). Diagnostic capability of salivary biomarkers in the assessment of head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncology*, 51(9), 805–818. <http://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.06.010>

Hayes, B., Briceno, A., Asher, A., Yu, M., Evans, J. L., Hahn, J. a, & Page, K. (2014). Preference, acceptability and implications of the rapid hepatitis C screening test among high-risk young people who inject drugs. *BMC Public Health*, 14(1), 645. <http://doi.org/10.1186/1471-2458-14-645>

Hu, S., Yu, T., Xie, Y., Yang, Y., Li, Y., Zhou, X., ... Wong, D. T. (2007). Discovery of oral fluid biomarkers for human oral cancer by mass spectrometry. *Cancer Genomics & Proteomics*, 4(2), 55–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17804867>

Humeau, M., Vignolle-Vidoni, A., Sicard, F., Martins, F., Bournet, B., Buscail, L., ... Cordelier, P. (2015). Salivary MicroRNA in Pancreatic Cancer Patients. *Plos One*, 10(6), e0130996. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0130996>

- Humphrey, S. P., & Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 85(2), 162–169. <http://doi.org/10.1067/mpre.2001.113778>
- Im, J., Kim, S., & Oh, J. (2011). OraQuick ® ADVANCE TM Rapid HIV-1 / 2 Antibody Test (OraQuick Test) in Dentistry : A Literature Review, 33(3), 286–291.
- Indira M, Chandrashekar P, Kattappagari KK, Chandra LK, Chitturi RT, BV RR. Evaluation of salivary glucose, amylase, and total protein in Type 2 diabetes mellitus patients. *Indian J Dent Res* 2015;26:271-5 <http://www.ijdr.in/article.asp?issn=0970-9290;year=2015;volume=26;issue=3;spage=271;epage=275;aulast=Indira>
- Joshi, M. S., Bhalla, S., Kalrao, V. R., Dhongade, R. K., & Chitambar, S. D. (2014). Exploring the concurrent presence of hepatitis A virus genome in serum, stool, saliva, and urine samples of hepatitis A patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78(4), 379–382. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.12.013>
- Kidd-Ljunggren, K., Holmberg, a., Bläckberg, J., & Lindqvist, B. (2006). High levels of hepatitis B virus DNA in body fluids from chronic carriers. *Journal of Hospital Infection*, 64(4), 352–357. <http://doi.org/10.1016/j.jhin.2006.06.029>
- Lee, S. R., Yearwood, G. D., Guillon, G. B., Kurtz, L. a., Fischl, M., Friel, T., ... Kardos, K. W. (2010). Evaluation of a rapid, point-of-care test device for the diagnosis of hepatitis C infection. *Journal of Clinical Virology*, 48(1), 15–17. <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.02.018>
- Lee, Y. H., Kim, J. H., Zhou, H., Kim, B. W., & Wong, D. T. (2012). Salivary transcriptomic biomarkers for detection of ovarian cancer: for serous papillary adenocarcinoma. *Journal of Molecular Medicine*, 90(4), 427–434. <http://doi.org/10.1007/s00109-011-0829-0>
- Maes, E., Mertens, I., Valkenborg, D., Pauwels, P., Rolfo, C., & Baggerman, G. (2015). Proteomics in cancer research: Are we ready for clinical practice? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. <http://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.07.006>
- Malon, R. S. P., Sadir, S., Balakrishnan, M., & Córcoles, E. P. (2014). Saliva-Based Biosensors: Noninvasive Monitoring Tool for Clinical

- Diagnostics. *BioMed Research International*, 2014(i), 1–20.
<http://doi.org/10.1155/2014/962903>
- Mascarenhas, P., Fatela, B., & Barahona, I. (2014). Effect of diabetes mellitus type 2 on salivary glucose - A systematic review and meta-analysis of observational studies. *PLoS ONE*, 9(7).
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0101706>
- Molina, R., Auge, J. M., Escudero, J. M., Marrades, R., Viñolas, N., Carcereny, E., ... Filella, X. (2009). Mucins CA 125, CA 19.9, CA 15.3 and TAG-72.3 as tumor markers in patients with lung cancer: Comparison with CYFRA 21-1, CEA, SCC and NSE. *Tumor Biology*, 29(6), 371–380. <http://doi.org/10.1159/000181180>
- Nelson, A. K., Caldas, A., Sebastian, J. L., Muñoz, M., Bonilla, C., Yamanija, J., ... Shin, S. (2012). Community-based rapid oral human immunodeficiency virus testing for tuberculosis patients in Lima, Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(3), 399–406.
<http://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0036>
- Nonaka, D., Fabbri, A., Roz, L., Mariani, L., Vecchione, A., Moore, G. W., ... Sozzi, G. (2005). Reduced FEZ1 / LZTS1 Expression and Outcome Prediction in Lung Cancer Reduced FEZ1 / LZTS1 Expression and Outcome Prediction in Lung Cancer, (4), 1207–1212.
<http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3461>
- OMS. (2006). *Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia*. Retrieved from
http://www.who.int/diabetes/publications/diagnosis_diabetes2006/en/index.html
- Panchbhai, A. S. (2012). Correlation of Salivary Glucose Level with Blood Glucose Level in Diabetes Mellitus. *Journal of Oral and Maxillofacial Research*, 3(3), 1–7. <http://doi.org/10.5037/jomr.2012.3303>
- Pao, W., & Girard, N. (2011). New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *The Lancet Oncology*, 12(2), 175–180.
[http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70087-5](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70087-5)
- Ricardo, J., Almeida, C. De, Pedrosa, N. D. L., Leite, J. B., & Ribeiro, T. (2007). Marcadores Tumoriais : Revisão de Literatura. *Oncologia*, 53(3), 305–316.

- Ross, J. S., & Fletcher, J. a. (1998). The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells*, 16(6), 413–428. <http://doi.org/10.1002/stem.160413>
- Satish, B. N. V. S., Srikala, P., Maharudrappa, B., Awanti, S. M., Kumar, P., & Hugar, D. (2014). Saliva: A tool in assessing glucose levels in Diabetes Mellitus. *Journal of International Oral Health : JIOH*, 6(2), 114–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4037799&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Sema Baltazar, C., Raposo, C., Jani, I. V., Shodell, D., Correia, D., Goncalves da Silva, C., ... Parekh, B. (2014). Evaluation of Performance and Acceptability of Two Rapid Oral Fluid Tests for HIV Detection in Mozambique. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(10), 3544–3548. <http://doi.org/10.1128/JCM.01098-14>
- Smith, B. D., Drobeniuc, J., Jewett, A., Branson, B. M., Garfein, R. S., Teshale, E., ... Weinbaum, C. M. (2011). Evaluation of three rapid screening assays for detection of antibodies to hepatitis C virus. *Journal of Infectious Diseases*, 204(6), 825–831. <http://doi.org/10.1093/infdis/jir422>
- St John, M. a R., Li, Y., Zhou, X., Denny, P., Ho, C.-M., Montemagno, C., ... Wong, D. T. W. (2004). Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Archives of Otolaryngology--Head & Neck Surgery*, 130(8), 929–935. <http://doi.org/10.1001/archotol.130.8.929>
- Streckfus, C., Bigler, L., Dellinger, T., Dai, X., Kingman, A., & Thigpen, J. T. (2000). The Presence of Soluble c- erb B-2 in Saliva and Serum among Women with Breast Carcinoma : A Preliminary Study The Presence of Soluble c-erbB-2 in Saliva and Serum among Women with Breast Carcinoma : A Preliminary Study 1, 6(June), 2363–2370.
- Streckfus, C., Bigler, L., Tucci, M., & Thigpen, J. T. (2000). A preliminary study of CA15-3, c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, cathepsin-D, and p53 in saliva among women with breast carcinoma. *Cancer Investigation*, 18(2), 101–109. <http://doi.org/10.3109/07357900009038240>
- Tan, W., Sabet, L., Li, Y., Yu, T., Klokkevold, P. R., Wong, D. T., & Ho, C. M. (2008). Optical protein sensor for detecting cancer markers in

saliva. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(2), 266–271.
<http://doi.org/10.1016/j.bios.2008.03.037>

- Thieme, T., Yoshihara, P., Piacentini, S., & Beller, M. (1992). Clinical evaluation of oral fluid samples for diagnosis of viral hepatitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(5), 1076–1079. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=265227&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Tourinho, R. S., Amado, L. A., Villar, L. M., Sampaio, D. V., Moraes, A. C., Rodrigues do Ó, K. M., ... de Paula, V. S. (2011). Importance of the cutoff ratio for detecting antibodies against hepatitis A virus in oral fluids by enzyme immunoassay. *Journal of Virological Methods*, 173(2), 169–174. <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.01.014>
- Van der Eijk, a a, Niesters, H. G., Gotz, H. M., Janssen, H. L., Schalm, S. W., Osterhaus, a D., & de Man, R. a. (2004). Paired measurements of quantitative hepatitis B virus DNA in saliva and serum of chronic hepatitis B patients: implications for saliva as infectious agent. *J Clin Virol*, 29(2), 92–94. [http://doi.org/10.1016/S1386-6532\(03\)00092-1](http://doi.org/10.1016/S1386-6532(03)00092-1)
- Vasconcelos, A. C. U., Soares, M. S. M., Almeida, P. C., & Soares, T. C. (2010). Comparative study of the concentration of salivary and blood glucose in type 2 diabetic patients. *Journal of Oral Science*, 52(2), 293–298. <http://doi.org/10.2334/josnusd.52.293>
- Vaughan, G., Goncalves Rossi, L. M., Forbi, J. C., de Paula, V. S., Purdy, M. a, Xia, G., & Khudyakov, Y. E. (2014). Hepatitis A virus: host interactions, molecular epidemiology and evolution. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 21, 227–43. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.10.023>
- Wang, Q., Gao, P., Cheng, F., Wang, X., & Duan, Y. (2013). Measurement of salivary metabolite biomarkers for early monitoring of oral cancer with ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 119, 299–305. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.11.008>
- Wang, Q., Gao, P., Wang, X., & Duan, Y. (2014a). Investigation and identification of potential biomarkers in human saliva for the early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Clinica Chimica Acta*, 427, 79–85. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2013.10.004>

- Wang, Q., Gao, P., Wang, X., & Duan, Y. (2014b). The early diagnosis and monitoring of squamous cell carcinoma via saliva metabolomics. *Scientific Reports*, 4, 6802. <http://doi.org/10.1038/srep06802>
- Wei, F., Lin, C.-C., Joon, A., Feng, Z., Troche, G., Lira, M. E., ... Wong, D. T. W. (2014). Noninvasive Saliva-based EGFR Gene Mutation Detection in Patients with Lung Cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 190(10), 1117–1126. <http://doi.org/10.1164/rccm.201406-1003OC>
- Xavier Santos, R. L., de Deus, D. M. V., de Almeida Lopes, E. P., Duarte Coêlho, M. R. C., & de Castro, J. F. L. (2015). Evaluation of viral load in saliva from patients with chronic hepatitis C infection. *Journal of Infection and Public Health*, 8(5), 474–480. <http://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.04.025>
- Xie, Z., Yin, X., Gong, B., Nie, W., Wu, B., Zhang, X., ... Li, Z. (2014). Salivary microRNAs Show Potential as a Noninvasive Biomarker for Detecting Resectable Pancreatic Cancer. *Cancer Prevention Research*, 8(2), 165–173. <http://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0192>
- Yang, J., Wei, F., Schafer, C., & Wong, D. T. W. (2014). Detection of Tumor Cell-Specific mRNA and Protein in Exosome-Like Microvesicles from Blood and Saliva. *PLoS ONE*, 9(11), e110641. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0110641>
- Zachary, D., Mwenge, L., Muyoyeta, M., Shanaube, K., Schaap, A., Bond, V., ... Ayles, H. (2012). Field comparison of OraQuick® ADVANCE Rapid HIV-1/2 antibody test and two blood-based rapid HIV antibody tests in Zambia. *BMC Infectious Diseases*, 12(1), 183. <http://doi.org/10.1186/1471-2334-12-183>
- Zhang, L., Farrell, J. J., Zhou, H., Elashoff, D., Akin, D., Park, N. H., ... Wong, D. T. (2010). Salivary Transcriptomic Biomarkers for Detection of Resectable Pancreatic Cancer. *Gastroenterology*, 138(3), 949–957.e7. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.11.010>
- Zhang, L., Xiao, H., Zhou, H., Santiago, S., Lee, J. M., Garon, E. B., ... Wong, D. T. W. (2012). Development of transcriptomic biomarker signature in human saliva to detect lung cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(19), 3341–3350. <http://doi.org/10.1007/s00018-012-1027-0>

- Zhevachevsky, N. G., Nomokonova, N. Y., Beklemishev, a B., & Belov, G. F. (2000). Dynamic study of HBsAg and HBeAg in saliva samples from patients with hepatitis B infection: diagnostic and epidemiological significance. *J Med Virol*, 61(4), 433–438. [http://doi.org/10.1002/1096-9071\(200008\)61:4<433::AID-JMV4>3.0.CO;2-5](http://doi.org/10.1002/1096-9071(200008)61:4<433::AID-JMV4>3.0.CO;2-5)
- Zhong, L. P., Zhang, C. P., Zheng, J. W., Li, J., Chen, W. T., & Zhang, Z. Y. (2007). Increased Cyfra 21-1 concentration in saliva from primary oral squamous cell carcinoma patients. *Archives of Oral Biology*, 52(11), 1079–1087. <http://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.05.005>